

平成25年4月26日提出

対象研究テーマ：マウスモデルを用いた消化器がん発生・悪性化に関する研究**研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日****研究題目：胃がん発症モデルマウスを用いた絶対定量プロテオーム解析による
がん微小環境変化と発がん機構の解析****研究代表者：愛媛大学プロテオミクス医学研究センター 教授 東山繁樹****研究成果の概要：**

大島正伸教授が保有する胃がん発症モデルマウス K19-Wnt1/C2mE マウスおよびそのコントロールマウス K19-C2mE マウスと野生型マウスの3系統マウスから、時間軸に沿って尿を採取し、プロテオーム解析を行った。その結果、約900種のタンパク質を検出し、K19-C2mE マウスに特異的な約120種のタンパク質、さらに、K19-Wnt1/C2mE マウスに特異的な約30種のタンパク質を検出した。これら合わせて約150種のタンパク質の安定同位体標識リコンビナントタンパク質を、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて作成し、各タンパク質のプロテオタイプピックペプチドを質量分析により決定した。この情報を基に、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) システムの構築を進めた。

研究分野：がんマーカー分子探索**キーワード：胃がん、マーカータンパク質、尿プロテオミクス、MRM、タンパク質絶対定量****1. 研究開始当初の背景**

これまでの発がんの分子機構解析には、既にがん化した組織（細胞）由来のゲノム解析による遺伝子異常の解析・同定が主流であり、これにより、多くのがん遺伝子やがん抑制遺伝子が発見・報告されてきた。しかし、顕著な遺伝子異常の見出されないがんも多く、発がんに至る過程での遺伝子変異によらない細胞の増殖・悪性化・転移等に関わる細胞内シグナル伝達因子をつぶさに解析することが極めて重要と考えられる。また、がん化細胞の増殖・悪性化には、これを支持するがん細胞周辺の微小環境の変化が極めて重要であることが、最近指摘されている。このような観点から、細胞のがん化に向けた変化とともに微小環境の変化をも解析するためには、①がん発症前段階から、がん化に至る過程を時間軸に沿って解析すること、②遺伝子解析では検出できない、細胞増殖や運動の変化や、がん細胞周辺の微小環境変化をモニタリングすること、の2点が必須である。そこで、①は、ヒトでは不可能であり、モデル動物の確立とその利用が不可欠である。金沢大学がん進展制御研究所の大島正伸教授が確立された胃がん発症モデルマウスは、100%胃がん発症のモデル動物として極めて有用であり、このモデルマウスを用いることで可能となる。また、②は、申請者のグループが、

独自に開発してきたタンパク質絶対定量プロテオミクス解析技術を基盤として、これまでに絶対定量が極めて困難とされている複数膜貫通型タンパク質をも含めたほぼ全てのタンパク質をアトモルからフェムトモルレベルで高感度・絶対定量することにより、生体分子の量的変動と様々な修飾による質的変動をモニタリングすることで可能となる。

2. 研究の目的

胃がん発症モデルマウスとタンパク質絶対定量プロテオミクス解析技術を融合させることで、これまでに報告の無い、胃がん発症前段階でのマウス生体のプロテオーム動態を的確に把握することを試みる。これにより、がん細胞増殖に向けたがん微小環境の変化をモニタリングすることを可能とし、新たな治療標的分子の解明に繋げる。また、これらの成果を、胃がん発症の分子機構解明、早期診断に向けてのバイオマーカー探索、ならびに、新規な早期診断法の開発にまで繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

K19 遺伝子プロモーターを用いて胃粘膜上皮で Wnt シグナルを亢進させた K19-Wnt1 マウス（胃粘膜には微小前癌病変が発生）、PGE2 経路を誘導させた K19-C2mE マウス（胃炎の

発生と、同時に粘液細胞からなる過形成病変が発生)、および、これらのマウスを交配して作製した K19-Wnt1/C2mE マウス (100%の効率で胃がん発生) の 3 系統マウスと正常コントロールマウスから、時間軸 (腫瘍形成がまだ確認できない 10 週齢から炎症を伴う腫瘍形成が認められる 55 週齢まで各週) に沿って尿を採取する。

2: 採取した各マウス尿のショットガンプロテオミクスを行い、尿中のタンパク質を同定する。

この解析結果より、K19-Wnt1 マウス、K19-C2mE マウス、K19-Wnt1/C2mE マウスにそれぞれ特異的な尿中タンパク質を同定する。

3: 実験項目 2 で同定する各マウス特異的タンパク質の血清中濃度を絶対定量するために、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) を構築する。

4: 実験項目 3 で構築する MRM システムと我々の持つタンパク質絶対定量用安定同位体標識内部標準タンパク質ライブラリー SIRPL を組み合わせ、各マウス特異的タンパク質の絶対定量を行う。

4. 研究成果

尿プロテオーム解析

胃がん発症モデルマウス K19-Wnt1/C2mE マウスおよびそのコントロールマウス K19-C2mE マウスと野生型マウスの 3 系統マウスから、時間軸に沿って尿を採取し、プロテオーム解析を行った。その結果、約 900 種のタンパク質を検出し、K19-C2mE マウスに特異的な約 120 種のタンパク質、さらに、K19-Wnt1/C2mE マウスに特異的な約 30 種のタンパク質を検出した。これら合わせて約 150 種のタンパク質の安定同位体標識リコンビナントタンパク質を、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて作成し、SIRPL に組み込んだ。さらに、各タンパク質のプロテオタイプックペプチドを質量分析により決定した。また、安定同位体標識効率は 99.7% と算出し、タンパク質絶対定量に品質の高い内部標準タンパク質として利用可能であることが示された。さらに、リコンビナントタンパク質を用いて、各タンパク質の特徴的なイオン化ペプチド (プロテオタイプックペプチド) を質量分析により決定した。

MRM システムの構築

リコンビナントタンパク質の質量分析に

より得られたプロテオタイプックペプチド情報を基に、このペプチドをタンデムに繋ぎ合わせた完全人工内部標準タンパク質 QconCAT をデザインし、これを再度、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて作成すると同時に、安定同位体標識した。作成した QconCAT 内部標準タンパク質が、内部標準として機能するかどうかを質量分析により検証し、確認した。各タンパク質より 3 種のプロテオタイプックペプチドを検出用チャンネルとして用い、合計 $150 \times 3 = 450$ 個の検出用チャンネルを作成した。この方法により、一度の解析で、150 種のタンパク質を絶対定量可能なシステムを構築できた。今後この測定システムを用いてマウス尿サンプル解析をさらに進め、有用なバイオマーカーを同定して行く。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 8 件)

Miwa D, Inoue H, Takemori N, Kurokawa M, Sakaue T, Fukuda S, Omi K, Goishi K, Higashiyama S. (2013) Protein kinase D2 and heat shock protein 90 beta are required for BCL6-associated zinc finger protein mRNA stabilization induced by vascular endothelial growth factor-A. *Angiogenesis in press*

Nakayama D, Fukuda S, Matsushita N, Nishida-Fukuda H, Inoue H, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S. (2013) HuR-mediated mRNA stabilization is required for UVB-induced autoinduction of amphiregulin in keratinocytes. *J. Biol. Chem. in press*

Nanba D, Toki F, Matsushita N, Matsushita S, Higashiyama S, Barrandon Y. Actin filament dynamics impacts keratinocyte stem cell maintenance. *EMBO Mol. Med.* 2013 in press

Diaz B, Yuen A, Higashiyama S, Courtneidge SA. (2013) Notch increases the shedding HB-EGF by ADAM12 to potentiate invadopodia formation in hypoxia. *J. Cell Biol.* In press

Nakayama H, Fukuda S, Inoue H, Nishida-Fukuda H, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S. (2012) Cell surface-annexins regulate ADAM-mediated

ectodomain shedding of proamphiregulin. Mol Biol Cell. 23, 1964-1975.

Gooz P, Dang Y, Higashiyama S, Twal WO, Haycraft CJ, Gooz M. (2012) A disintegrin and metalloenzyme (ADAM) 17 activation is regulated by $\alpha 5 \beta 1$ integrin in kidney mesangial cells. PLoS One. 7, e33350.

Ohnuki H, Inoue H, Takemori N, Nakayama H, Sakaue T, Fukuda S, Miwa D, Nishiwaki E, Hatano M, Tokuhisa T, Endo Y, Nose M, Higashiyama S. (2012) BAZF, a novel component of cullin3-based E3 ligase complex, mediates VEGFR and Notch cross-signaling in angiogenesis. Blood. 119, 2688-2698.

Yoshida M, Shimura T, Fukuda S, Mizoshita T, Tanida S, Kataoka H, Kamiya T, Nakazawa T, Higashiyama S, Joh T. (2012) Nuclear translocation of pro-amphiregulin induces chemoresistance in gastric cancer. Cancer Sci. 103, 708-715.

〔学会発表〕（計 1 件）

Takemori N, Takemori A, Higashiyama S. Absolute Quantitative Analysis of Urinary Proteome Alterations Using Wheat Germ Cell Free Protein Synthesis and MRM Mass Spectrometry. HUPO 11th Annual World Congress, September 9-13, 2012, Boston, MA

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

愛媛大学プロテオ医学研究センター・
教授 東山繁樹

(2) 研究分担者

愛媛大学プロテオ医学研究センター・
講師 武森信暁

(3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学・教授 大島正伸